

正辛酸沉淀在单克隆抗体纯化中的工艺优化与应用

杨忠华^{1,2}, 周建芹^{1*}

1 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215000

2 信达生物(苏州)有限公司, 江苏 苏州 215000

杨忠华, 周建芹. 正辛酸沉淀在单克隆抗体纯化中的工艺优化与应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3757-3771.

YANG Zhonghua, ZHOU Jianqin. Optimization and application of caprylic acid precipitation in the purification of monoclonal antibody[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3757-3771.

摘要: 为应对治疗性抗体快速增长的市场需求, 抗体上游细胞培养规模和表达量水平已显著提高, 而下游纯化工艺的生产效率则相对落后, 下游处理能力已成为限制抗体产能的瓶颈。本研究以单克隆抗体 mab-X 为实验材料, 优化了细胞培养液、低 pH 病毒灭活收集液 2 种模式的正辛酸 (caprylic acid, CA) 沉淀工艺条件, 并研究了 CA 处理去除聚体、CA 处理灭活病毒等 2 种应用, 在小试的基础上, 采用低 pH 病毒灭活收集液 CA 沉淀的模式进行了 500 L 细胞培养规模生产放大研究, 对沉淀前后的产品质量和收率进行了检测和对比。结果显示, 两种模式的 CA 沉淀均可显著降低宿主细胞蛋白(host cell protein, HCP)残留和聚体含量, 在聚体去除实验中 CA 沉淀可去除约 15% 的聚体, 病毒灭活研究显示 CA 对逆转录模型病毒具有完全的病毒灭活能力。在放大生产规模中, 下游依次进行了深层过滤收获、亲和层析、低 pH 病毒灭活、CA 沉淀及深层过滤、阳离子交换层析, CA 沉淀过程中混合时间和搅拌速度显著影响 CA 沉淀效果, CA 沉淀处理后低 pH 病毒灭活液中的 HCP 残留量降低了 895 倍, 沉淀后产品纯度和 HCP 残留均已控制在单克隆抗体质量要求范围内, CA 沉淀可以减少传统纯化工艺中的一个精纯步骤。总之, 下游工艺中采用 CA 沉淀, 能够精简传统纯化工艺, 并完全满足 mab-X 的纯化质量要求, 而且能提高生产效率、降低生产成本。本研究结果将推动 CA 沉淀在单克隆抗体下游纯化生产中的应用, 为解决目前传统纯化工艺的问题提供参考。

关键词: 工艺放大; 宿主细胞蛋白残留; 聚体; 病毒灭活; Triton X-100 替换

资助项目: 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD); 苏州市科技计划项目(SNG2022048, SNG2022028)

This work was supported by the Priority Academic Program Development of the Jiangsu Higher Education Institutes (PAPD) and the Suzhou Science and Technology Planning Project (SNG2022048, SNG2022028).

*Corresponding author. E-mail: zhoujianqin@suda.edu.cn

Received: 2022-11-06; Accepted: 2023-03-17; Published online: 2023-03-23

Optimization and application of caprylic acid precipitation in the purification of monoclonal antibody

YANG Zhonghua^{1,2}, ZHOU Jianqin^{1*}

1 College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu, China

2 Innovent Biologics, Inc., Suzhou 215000, Jiangsu, China

Abstract: In response to the market demand for therapeutic antibodies, the upstream cell culture scale and expression titer of antibodies have been significantly improved, while the production efficiency of downstream purification process is relatively fall behind, and the downstream processing capacity has become a bottleneck limiting antibody production throughput. Using monoclonal antibody mab-X as experimental material, we optimized the caprylic acid (CA) precipitation process conditions of cell culture fluid and low pH virus inactivation pool, and studied two applications of using CA treatment to remove aggregates and to inactivate virus. Based on the lab scale study, we carried out a 500 L scale-up study, where CA was added to the low pH virus inactivation pool for precipitation, and the product quality and yield before and after precipitation were detected and compared. We found that CA precipitation significantly reduced HCP residuals and aggregates both before and after protein A affinity chromatography. In the aggregate spike study, CA precipitation removed about 15% of the aggregates. A virus reduction study showed complete clearance of a model retrovirus during CA precipitation of protein A purified antibody. In the scale-up study, the depth filtration harvesting, affinity chromatography, low pH virus inactivation, CA precipitation and depth filtration, and cation exchange chromatography successively carried out. The mixing time and stirring speed in the CA precipitation process significantly affected the CA precipitation effect. After CA precipitation, the HCP residue in the low pH virus inactivation solution decreased 895 times. After precipitation, the product purity and HCP residual meet the quality criteria of monoclonal antibodies. CA precipitation can reduce the chromatography step in the conventional purification process. In conclusion, CA precipitation in the downstream process can simplify the conventional purification process, fully meet the purification quality criterion of mab-X, and improve production efficiency and reduce production costs. The results of this study may promote the application of CA precipitation in the purification of monoclonal antibodies, and provide a reference for solving the bottleneck of the current purification process.

Keywords: scale-up; residual host cell protein; aggregates; virus inactivation; Triton X-100 replacement

单克隆抗体(简称单抗)药物是发展最为迅速的生物药,在我国已有几十款单抗药物被纳入医保^[1-2]。目前,单抗的生产规模可达每年数百公斤原料药。单抗的生产需要对产能进行大

量投资,控制成本、提高产能、绿色低碳是药品生产工艺的发展方向 and 必然要求。

在过去的几十年,单抗生产上游工艺的蛋白表达水平及生产规模都有了突破性的进展。抗体表达

水平从 0.5 g/L 以下上升到了 10–15 g/L, 甚至更高。在反应器规模上, 从单反应器体积 500 L 以下上升到了 1 000–100 000 L。细胞培养技术显著提高, 单抗的产量提高了 10 倍, 然而下游工艺的生产效率仍然落后, 纯化环节的处理能力成为限制产能的瓶颈, 主要生产成本也转移到了下游^[3-4]。

传统单抗下游纯化生产工艺过程包括深层过滤收获、亲和层析捕获、低 pH 病毒灭活、深层过滤、阴离子交换层析、阳离子交换层析、除病毒过滤和超滤等。单抗的纯化质量主要取决于 3 个层析步骤: 蛋白 A 亲和层析和阴、阳离子交换 2 个精纯步骤^[5]。传统工艺存在 3 方面的问题: 一是生产能力通量较低, 设备设施适应性差; 二是单克隆抗体蛋白表达水平提高及生产规模的扩大, 要求下游纯化工艺采用更大的层析柱和缓冲液储液罐, 制药企业面临更大规模生产厂房的工程设计难题和更多的资金投入; 三是下游纯化成本高。提高处理能力和控制成本是下游纯化亟需解决的问题。

正辛酸(caprylic acid, CA)是一种含有 8 个碳原子的短链饱和脂肪酸, 也称为羊脂酸。将 CA 用于沉淀蛋白质的研究可以追溯到约 50 年前。最初, CA 的应用仅限于在低 pH 值下从哺乳动物血清中分离有价值的蛋白质, 例如免疫球蛋白, 该方法是血浆分离的标准方法^[6]。近 10 年来, 有研究将 CA 沉淀用于中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovaries, CHO)细胞培养的单克隆抗体的纯化^[7-10]。据报道, CA 也是灭活包膜病毒的有效试剂^[11-13]。但是, CA 沉淀目前主要仅限于实验室小规模技术研究和理论探讨, 缺乏大规模应用的相关研究。

本研究以代号为 mab-X 的单克隆抗体为研究对象, 研究 CA 沉淀在单克隆抗体下游纯化药物生产中的应用, 优化 CA 沉淀的条件, 并研究 CA 沉淀用于中试规模 mab-X 的纯化程度及工艺稳定性, 探讨该方法在抗体制药工业中应用的可行性及优势, 推动 CA 沉淀在单克隆

抗体下游纯化生产中的应用, 为解决目前传统纯化工艺的问题提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

单克隆抗体 mab-X 是信达生物(苏州)有限公司的基因工程 CHO 细胞生产的某单克隆抗体。CA 购自 Merck。深层过滤膜 MD0HC 和 MX0HC 购自 Millipore。亲和层析填料 MabSelectTM SuRe Protein A 购自 GE Healthcare。Vantage 层析柱(内径 1.1 cm)购自 Millipore。POROS 0.5 mL 蛋白 G 柱购自 Applied Biosystems。阳离子交换层析填料 Fractogel EMD SO₃⁻ (M) 购自 Merck。G3000SWxl 柱购自 Tosoh Bioscience。CHO HCP 第三代试剂盒购自 Cygnus Technologies。Tris 购自 ANGUS Chemical Company, 氯化钠购自江苏省勤奋药业有限公司, 柠檬酸及柠檬酸钠购自湖南尔康制药股份有限公司, 氢氧化钠购自四川金山制药有限公司。

1.2 仪器和设备

ÄKTATM Pure 150 及 Avant 150 系统购自 GE Healthcare, 用于实验室规模的层析样品制备。ÄKTATM Process 系统、BPG300 层析柱、BPG140 层析柱购自 GE Healthcare 用于中试和生产规模的层析样品制备。HPLC 2690 分离模块与 Waters 2487 Dual 吸光度检测器购自 Waters, 二者结合进行高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析。NanoDrop 2000 购自 Thermo Scientific, 用于紫外吸光度测定。TDZ5-WS 台式离心机购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, 用于细胞培养液的离心。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养液的 CA 沉淀

细胞培养液的 CA 沉淀 DoE 实验设计如表 1 所示。

用 2 mol/L 柠檬酸将细胞培养液(含细胞)滴定至实验 pH 值(4.7、5.1 或 5.5), 然后加入 0.2%–0.8% (体积分数)的 CA 开始沉淀, 并通过 pH 调节保持 pH 值。在环境温度下以 200 r/min 磁力搅拌混合物 30–90 min, 然后用 2 mol/L Tris 溶液滴定至 pH 7.0。8 000 r/min 离心 10 min 去除沉淀物, 然后通过 0.2 μ m 过滤器过滤, 收集过滤液。具体实验设计见表 2。以未加 CA 沉淀的细胞培养液过滤液为对照(control check, CK)。

1.3.2 低 pH 病毒灭活收集液 CA 沉淀

低 pH 病毒灭活收集液 CA 沉淀, 针对 pH 和 CA 浓度的实验设计如表 3 所示。

表 1 细胞培养液 CA 沉淀参数设置

Table 1 Setting of CA precipitation parameters of cell culture fluid

Level	CA concentration (%)	pH	Time (min)
Low	0.2	4.7	30
Mid	0.5	5.1	60
High	0.8	5.5	90

表 2 细胞培养液 CA 沉淀完全析因实验设计

Table 2 Full factorial design of CA precipitation in cell culture fluid

No.	CA concentration (%)	pH	Time (min)
1	0.5	5.1	60
2	0.8	5.5	90
3	0.5	5.1	60
4	0.2	4.7	30
5	0.8	4.7	90
6	0.8	4.7	30
7	0.2	4.7	90
8	0.8	5.5	30
9	0.2	5.5	90
10	0.2	5.5	30

表 3 低 pH 病毒灭活收集液 CA 沉淀参数设置

Table 3 Setting of CA precipitation parameters of low pH virus inactivation pool

Level	CA concentration (%)	pH
Low	0.10	4.5
Mid	0.15	4.9
High	0.20	5.3

蛋白 A 亲和层析收集液样品在低 pH 值下孵育, 然后用 20 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠(pH 5.0)将蛋白质浓度稀释到 5 mg/mL 以下, 并将 pH 值调整到 4.5–5.3 之间。通过加入 0.10%–0.20% (体积分数)的 CA 开始沉淀, 并通过 pH 调节保持 pH。在环境温度下以 200 r/min 磁力搅拌混合物 90 min。通过 0.2 μ m 过滤器过滤除去沉淀物。根据工艺收率和产品质量选择最佳 pH 值和 CA 浓度条件。具体实验设计见表 4。以未加 CA 沉淀的低 pH 病毒灭活后的过滤液为对照。

1.3.3 CA 处理去除聚体研究

细胞培养液通过 MD0HC 和 MX0HC 两级串联的深层过滤, 收集过滤液, 然后进行蛋白 A 亲和层析, 将蛋白 A 亲和层析纯化收集的单克隆抗体在 pH 3.2、27 $^{\circ}$ C 条件下孵育 140 min 制备聚体。

在上述方法制备的含聚体的单克隆抗体溶液中加入 0.16% CA, 并调整溶液 pH 至 5.0, 400 r/min 搅拌 90 min, 进行 CA 沉淀和吸附深层过滤, 对滤液进行高效液相分子排阻色谱法(size exclusion chromatography high performance liquid chromatography, SEC-HPLC)纯度分析。

表 4 低 pH 病毒灭活收集液 CA 沉淀响应面实验设计
Table 4 Response surface methodology of CA precipitation in low pH virus inactivation pool

No.	Mode	CA concentration (%)	pH
1	00	0.15	4.9
2	+-	0.20	4.5
3	0a	0.15	4.5
4	-+	0.10	5.3
5	--	0.10	4.5
6	00	0.15	4.9
7	00	0.15	4.9
8	++	0.20	5.3
9	A0	0.20	4.9
10	a0	0.10	4.9
11	0A	0.15	5.3

--: Indicates low value; +: Indicates high value; 0: Indicates midrange (center) value; a: Indicates low axial value; A: Indicates high axial value.

1.3.4 CA 处理灭活病毒研究

病毒去除研究在苏州药明检测检验有限责任公司检测,以评估 CA 的病毒灭活能力。病毒灭活条件:低 pH 病毒灭活收集液蛋白浓度 4 g/L, pH 5.2, CA 浓度 0.16%。异嗜性小鼠白血病病毒(xenotropic murine leukemia virus, X-MuLV)和伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)在添加 CA 之前加入。将混合物在(18.0±1)°C 下孵育,并使用混悬仪进行间歇性的振荡混合。在 15、30、60 和 90 min 取样确定 90 min 内病毒灭活的动力学。在每个时间点将样品稀释至无毒和无干扰作用水平,中和至 pH 值 6.5–7.5,用 0.45 μm 过滤器过滤,并使用噬菌斑形成单位(plaque forming unit, PFU)方法检测感染性病毒。

1.3.5 中试放大

工艺放大前先研究了搅拌转速和混合时间对 CA 沉淀的影响,实验样品为低 pH 病毒灭活收集液,在搅拌转速研究中,CA 添加量为 0.16%,在环境温度下搅拌 90 min,研究搅拌转速的影响,在混合时间研究中,CA 添加量为 0.16%,在环境温度下以 400 r/min 转速搅拌,研究混合时间的影响,沉淀物均通过 MX0HC 深层过滤除去。

在工艺放大时,细胞培养反应器规模 500 L,下游生产流程为:深层过滤收获,亲和层析,低 pH 病毒灭活,CA 沉淀及深层过滤,阳离子交换层析。

蛋白 A 亲和层析在 BPG300 柱上进行。层析柱平衡后以<35 g/L 的载量上样,单克隆抗体用 100 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠(pH 3.6)洗脱。

亲和洗脱液用 2 mol/L 柠檬酸调节 pH 至 3.5,进行低 pH 病毒灭活,孵育 60 min 后,用 2 mol/L Tris 中和至 pH 5.0。

CA 添加量为 0.16%,搅拌时间 90 min,搅拌转速 60 r/min,温度为室温,沉淀物通过

MX0HC 深层过滤去除。

阳离子交换层析在 BPG140 柱上进行。层析柱平衡后以<40 g/L 的载量上样,以线性梯度的方式洗脱。

1.3.6 检测方法

检测用样品制备:纯化前用于检测的样品先通过蛋白 A 亲和层析在 1.1 cm×10 cm 柱上制备,收集洗脱液,用 2 mol/L Tris 中和。

使用 POROS 0.5 mL 蛋白 G 柱测定细胞培养液中的蛋白浓度,使用 NanoDrop 2000 通过 280 nm 处的吸光度测定纯化后的蛋白浓度,计算单克隆抗体收率。

单体和聚体含量 SEC 分析利用 G3000SWxl 柱在 HPLC 2695 分离模块和 Waters 2487 Dual 1 吸光度仪上进行分析。以 0.5 mL/min 的流速运行,使用 20 mmol/L 磷酸钠+200 mmol/L 氯化钠(pH 7.0)作为流动相,进样 100 μg 样品。

宿主细胞蛋白(host cell protein, HCP)含量通过 Cygnus Technologies 的 CHO HCP 第三代试剂盒,酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定。

2 结果与分析

2.1 CA 沉淀的工艺优化

基于前期研究发现,CA 沉淀可以用于蛋白 A 亲和层析前或在蛋白 A 亲和层析之后。本研究分别开展了蛋白 A 亲和层析前后的 CA 沉淀研究,分别将 CA 添加到细胞培养液和低 pH 病毒灭活收集液中沉淀杂质,分别进行工艺优化,并对细胞培养液中的 CA 沉淀与低 pH 病毒灭活收集液的 CA 沉淀结果进行了比较,最终选择 CA 沉淀在单抗下游工艺中的最佳工艺阶段。

2.1.1 细胞培养液的 CA 沉淀

pH、处理时间和 CA 浓度是影响细胞培养液 CA 沉淀的关键工艺参数,为了开发稳健的

CA 沉淀工艺, 进行了实验设计 (design of experiments, DoE) 实验, 并以单抗收率、CA 沉淀后的 HCP 残留、蛋白 A 亲和层析收集液 HCP 残留、SEC-HPLC 纯度为评价指标, 结果见表 5。细胞培养液 CA 沉淀模型方差分析见表 6。细胞培养液 CA 沉淀因子响应值见表 7。细胞培养液 CA 沉淀预测刻画器见图 1。参数设计空间见图 2。

如表 5 所示, 各实验组之间存在显著差异。以细胞培养液未经 CA 沉淀作为对照, 经不同条件 CA 沉淀之后, 收率在 82%–100% 之间波动, 说明 CA 沉淀条件对收率有显著影响。HCP 残留在 263 215.3–511 027.3 ng/mg 之间波动, 蛋白 A 层析收集液 HCP 残留在 1 484.1–7 834.9 ng/mg 之间波动, 蛋白 A 层析收集液 SEC-HPLC 在 95.1%–98.0% 之间波动, 相较于

未经 CA 沉淀均有提升, 说明 CA 沉淀条件对单抗杂质残留及纯度有显著影响。

采用 JMP 软件对收率、HCP 残留和蛋白 A 层析收集液 SEC-HPLC 纯度、CA 沉淀后 HCP 残留建立模型。表 6 方差分析结果显示方差显著, 均方根误差 (root mean square error, RMSE) 较小, R^2 和调整 R^2 大于 0.7, 表明模型显著, 能够用于分析参数影响和预测实验结果。表 7 数据分析和图 1 表明, CA 浓度对抗体收率、CA 沉淀后 HCP 残留、蛋白 A 层析收集液 SEC-HPLC 纯度、蛋白 A 层析收集液 HCP 残留影响显著。pH 主效应仅对抗体收率有显著影响, 但 pH 与 CA 浓度的交互效应对抗体收率、CA 沉淀后 HCP 残留及蛋白 A 层析收集液 HCP 残留均有显著影响。时间对收率影响显著, 随着 CA 处理时间的延长收率下降。

表 5 细胞培养液 CA 沉淀实验结果

Table 5 CA precipitation test results of cell culture fluid

No.	Antibody yield (%)	CA precipitated HCP (ng/mg)	Post protein A HCP (ng/mg)	Post protein A SEC-HPLC (%)
1	89	353 398.8	2 346.6	97.3
2	82	263 215.3	1 484.1	98.0
3	87	349 224.4	2 886.0	97.3
4	93	402 167.5	4 933.8	95.9
5	82	318 333.9	3 652.9	97.6
6	83	376 512.9	3 266.5	97.0
7	90	404 617.3	2 704.2	97.0
8	87	321 778.5	3 091.6	96.8
9	98	488 726.3	7 021.6	95.3
10	100	511 027.3	7 834.9	95.1
CK	100	529 265.9	18 252.3	93.5

表 6 细胞培养液 CA 沉淀模型方差分析

Table 6 Model ANOVA analysis of CA precipitation in cell culture fluid

Response	RMSE	ANOVA	R^2	Adjust R^2
Antibody yield	1.0	0.000 4	0.97	0.95
CA precipitated HCP	25 449.0	0.003 2	0.94	0.89
Post protein A HCP	1 124.2	0.034 5	0.83	0.70
Post protein A SEC-HPLC	0.5	0.020 3	0.87	0.76

表 7 细胞培养液 CA 沉淀因子响应值

Table 7 Factor response of CA precipitation in cell culture fluid

Factor	P value			
	Antibody yield	CA precipitated HCP	Post protein A SEC-HPLC	Post protein A HCP
CA concentration	<0.000 1*	0.000 7*	0.006 3*	0.018 1*
pH	0.004 5*	0.300 4	0.148 7	0.185 8
Time	0.036 4*	0.116 2	0.069 8	0.237 6
pH*CA concentration	0.036 4*	0.008 4*	0.101 6	0.029 9*

*: Indicates that the factor is significant.

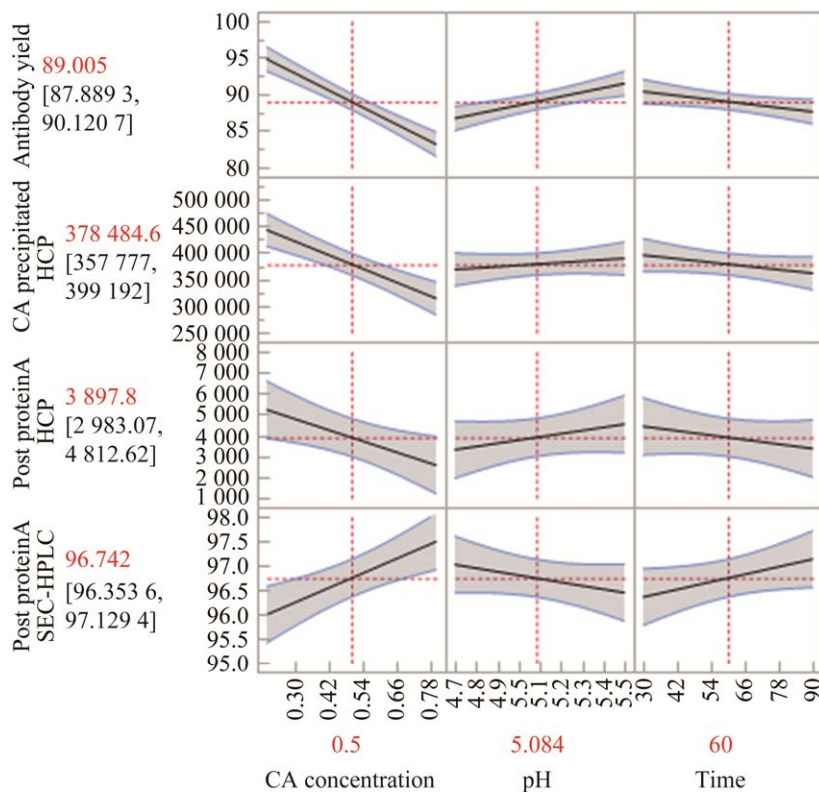


图 1 细胞培养液 CA 沉淀预测刻画器

Figure 1 Prediction profiler of CA precipitation in cell culture fluid. Antibody yield, CA precipitated HCP level, percent monomer in SEC, and post protein A HCP level were analyzed as a function of CA concentration, pH and time. The blue lines represent the confidence intervals of prediction profiles.

综合考虑单抗收率、HCP 残留和 SEC-HPLC 纯度，优化细胞培养液沉淀参数，得优化的设计空间如图 2 所示。在图示橙色矩形区域内，细胞培养液 CA 沉淀在 pH 4.8±0.1 条件下使用 0.2%–0.3% CA 混合 80–90 min，CA 沉淀后 HCP 残留≤420 000 ng/mg，收率≥88%，蛋

白 A 层析收集液 SEC-HPLC 纯度≥96.5%，蛋白 A 层析收集液 HCP 残留≤4 000 ng/mg，对照组 SEC-HPLC 纯度为 93.5%，蛋白 A 收集液 HCP 残留为 18 252.3 ng/mg，与对照组结果相比，在细胞培养液中进行 CA 沉淀蛋白 A 层析收集液的质量有明显的提升。

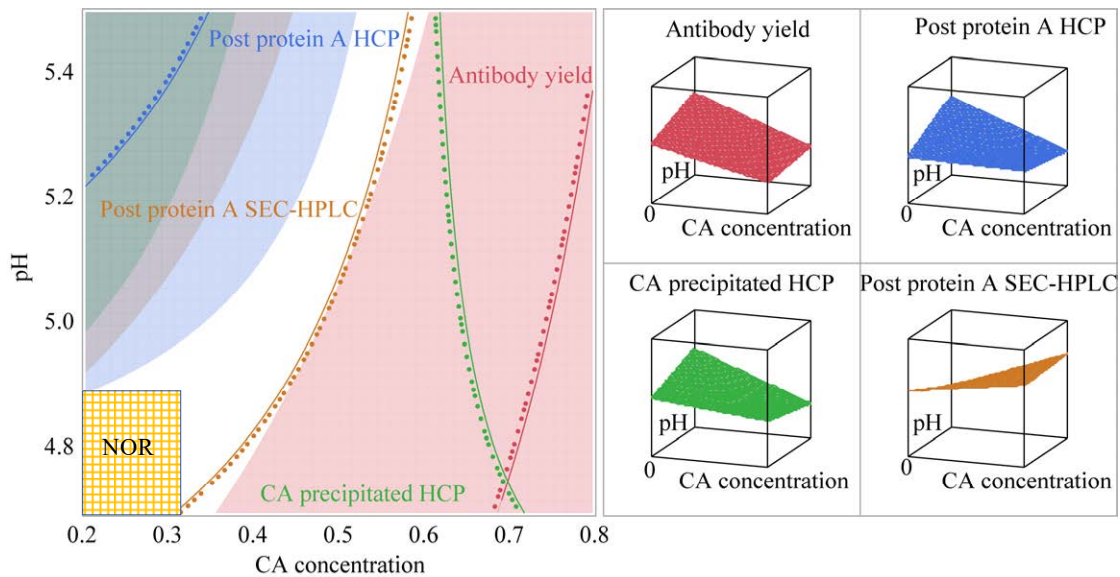


图 2 细胞培养液 CA 沉淀等高线图

Figure 2 Contour plot of CA precipitation in cell culture fluid. Contour plot at 80 minutes showing the operational range in terms of pH and CA concentration. The orange box indicates the current limits of the normal operating range (NOR) used in manufacturing for routine processing.

2.1.2 低 pH 病毒灭活收集液的 CA 沉淀

pH 和 CA 浓度是低 pH 病毒灭活收集液 CA 沉淀工艺的关键控制参数，为了开发稳健的低 pH 病毒灭活收集液的 CA 沉淀工艺，进行了 DoE 实验，并以 HCP 残留、SEC-HPLC 纯度以及产品收率为评价指标，结果见表 8。模型方差分析见表 9。因子响应值见表 10。预测刻画器见图 3。参数设计空间见图 4。

如表 8 所示，实验组之间存在显著差异。以未经 CA 沉淀作为对照，经不同条件 CA 沉淀之后，收率在 74%–101% 之间波动，SEC-HPLC 纯度在 94.8%–98.0%，HCP 残留在 132.6–4 376.3 ng/mg 之间波动，相较于对照组均有提升，说明 CA 沉淀条件对收率和单抗纯度均有显著影响。

表 9 方差分析结果表明，收率、HCP 残留和 SEC-HPLC 纯度模型能够用于分析参数影响和预测实验结果。表 10 数据分析和图 3 表明，pH 和 CA 浓度都会影响 SEC-HPLC 纯度和 HCP

残留。随着 pH 值降低和 CA 浓度增加，HCP 残留降低、SEC-HPLC 纯度提高，但相反地，抗体收率降低。

表 8 低 pH 病毒灭活收集液 CA 沉淀实验结果
Table 8 CA precipitation test results of low pH virus inactivation pool

No.	Yield (%)	SEC-HPLC (%)	HCP (ng/mg)
1	82	96.0	652.9
2	74	98.0	132.6
3	82	97.4	199.9
4	89	95.8	3 961.0
5	94	95.3	1 863.1
6	89	96.8	916.5
7	86	96.1	838.3
8	86	95.6	1 150.7
9	82	97.1	261.0
10	101	94.8	4 376.3
11	91	96.2	1 351.4
CK	N/A	95.4	6 297.4

表9 低 pH 病毒灭活收集液 CA 沉淀模型方差分析
Table 9 Model ANOVA analysis of CA precipitation in low pH virus inactivation pool

Response	RMSE	ANOVA	R square	Adjust R square
Yield	4.0	0.010 2	0.79	0.71
SEC-HPLC	0.4	0.011 8	0.91	0.82
HCP	522.4	0.000 5	0.91	0.87

表10 低 pH 病毒灭活收集液 CA 沉淀因子响应值
Table 10 Factor response of CA precipitation in low pH virus inactivation pool

Factor	P value		
	Yield	SEC-HPLC	HCP
pH	0.137 1	0.025 9*	0.012 5*
CA concentration	0.003 1*	0.004 7*	0.000 3*
pH*CA concentration	0.065 2	0.015 7*	N/A
CA concentration	N/A	0.108 8	0.007 8*
*CA concentration			
pH* pH	N/A	0.220 5	N/A

*: Indicates that the factor is significant, N/A indicates that the model does not include this factor.

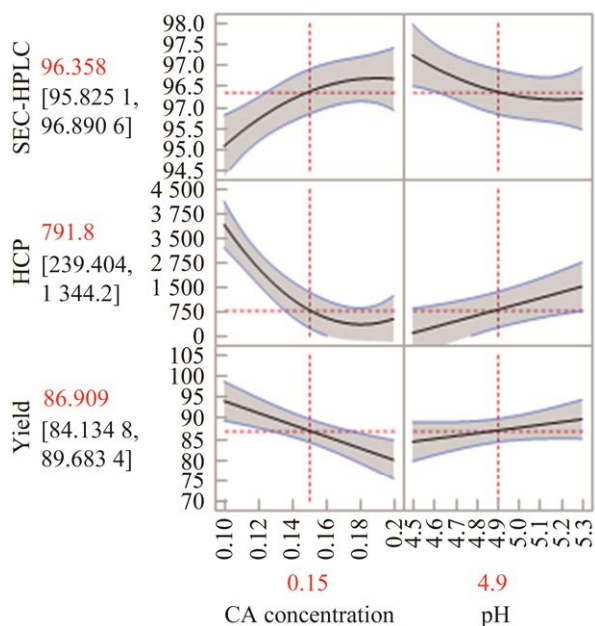


图3 低 pH 病毒灭活收集液 CA 沉淀预测刻画器图
Figure 3 Prediction profiler of CA precipitation in low pH virus inactivation pool. Step yield, HCP level, and percent monomer in SEC were analyzed as a function of pH and CA concentration. The blue lines represent the confidence intervals of prediction profiles.

综合考虑收率、HCP 残留和 SEC-HPLC 纯度, 优化低 pH 病毒灭活收集液 CA 沉淀参数, 得优化的设计空间如图 4 所示。在图示橙色矩形区域内, pH 5.0 ± 0.2 和 $(0.16 \pm 0.1)\%$ CA 含量范围内, 收集液 SEC-HPLC 纯度 $\geq 96\%$, 收集液 HCP 残留 ≤ 1300 ng/mg, 收率 $\geq 82\%$ 。对照组 SEC-HPLC 纯度为 95.4%, HCP 残留为 6297.4 ng/mg。与不加 CA 的对照组结果相比, 在低 pH 病毒灭活收集液进行 CA 沉淀, 对 SEC-HPLC 纯度有明显提升, HCP 残留显著降低。

CA 与蛋白质特定位点的结合会诱导其高级结构展开, 蛋白质的整个表面变得疏水, 诱导蛋白质相互作用, 最终导致沉淀^[9,14]。在较低的 pH 值下, CA 主要以非电离形式存在 (CA pKa=4.89), 此时 CA 的溶解度较低, CA 的辛基部分疏水性占主导地位, 具有相对碱性 pI 的抗体短时间内具有足够的电荷来抵消疏水性并保留在溶液中, 此时 CA 的溶解度低于沉淀单抗蛋白所需的临界浓度。而酸性物质如 HCP 和 DNA, 通常具有比抗体低的 pI 值, 电荷较少, 没有足够的电荷来抵消疏水性, 因此可以在较低的 pH 值、较低的 CA 浓度下聚集沉淀^[4,15], 从而从抗体中除去。

综合以上结果, 细胞培养液的 CA 沉淀或低 pH 病毒灭活收集液的 CA 沉淀, 均能够有效沉淀杂质。但是, 由于细胞培养液未经纯化和富集, 体积更大, 添加 CA 的用量远大于在低 pH 病毒灭活收集液中添加的用量。从未来商业化生产原材料成本控制的角度考虑, 在低 pH 病毒灭活收集液中添加 CA 更有优势, 因此本研究选择在亲和层析后低 pH 病毒灭活收集液中添加 CA 的方式进行中试生产研究。

2.2 CA 处理去除聚体

由于 mab-X 在进行 CA 沉淀前 SEC-HPLC 纯度已达到约 95%, 聚体含量较低, 不能真实反映 CA 沉淀的聚体除去能力, 为了考察 CA 沉

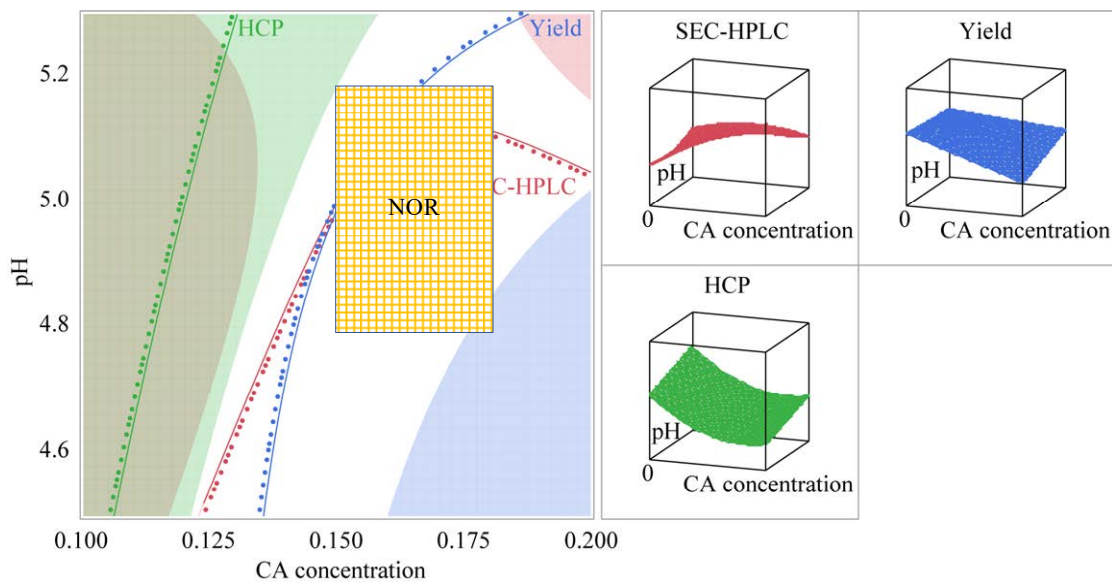


图 4 低 pH 病毒灭活收集液 CA 沉淀等高线图

Figure 4 Contour plot of CA precipitation in low pH virus inactivation pool. Contour plot showing the operational range in terms of pH and CA concentration. The orange box indicates the current limits of the NOR used in manufacturing for routine processing.

淀对聚体的去除能力, 本研究进行了 3 个平行的聚体去除挑战实验, 结果如表 11 所示。SEC-HPLC 检测结果见图 5、图 6。

如表 11、图 5 和图 6 所示, 聚体制备实验大大提高了亲和层析洗脱液的聚体含量, SEC-HPLC 纯度从约 95%降低至 79.1%。采用 CA 沉淀工艺后, 将对照样品的 SEC-HPLC 纯度由 79.1%提高至 94.2%–96.6%, 优于已有的报道^[6-9], 表明优化后的 CA 沉淀具有优异的聚体去除能力。

在较低的 pH 值下, CA 溶解度较低, 可溶的 CA 浓度低于蛋白沉淀所需的临界浓度^[14], 但是随着反应的进行, 展开的蛋白高级结构暴露出更多结合 CA 的位置, 抗体疏水性增强。当抗体间的疏水作用力大于同种电荷的排斥力, 最终也会导致沉淀。蛋白聚体通常具有更强的疏水性, 推测这是 CA 沉淀可以在沉淀单体之前优先沉淀聚体的原因。

2.3 CA 处理灭活病毒

单克隆抗体目前主要为 CHO 细胞生产, 存在病毒污染风险, 根据现行法规和一般原则的要求, 通常在纯化工艺中增加低 pH 或有机溶剂/去污剂(solvent/detergent, S/D)病毒灭活和膜过滤病毒清除步骤, 并进行病毒清除效果验证^[16]。对脂包膜病毒最有效的灭活方法是用去污剂或几种溶剂和去污剂的组合来处理, 在过去 30 年中, Triton X-100 是使用最广泛的去垢剂之一。最近, 因为 Triton X-100 的一种降解产物具有类似激素的活性, 可能对野生动物产生影响, 欧洲化学品管理局将 Triton X-100 列入了授权清单, 对其使用进行限制。现在, 制药行业因此受影响, 面临的挑战是找到一种替代 Triton X-100 的去垢剂, 理

表 11 聚体挑战实验结果

Assay	CK (without of CA precipitation)	Run 1	Run 2	Run 3
SEC-HPLC	79.1%	96.6%	95.3%	94.2%

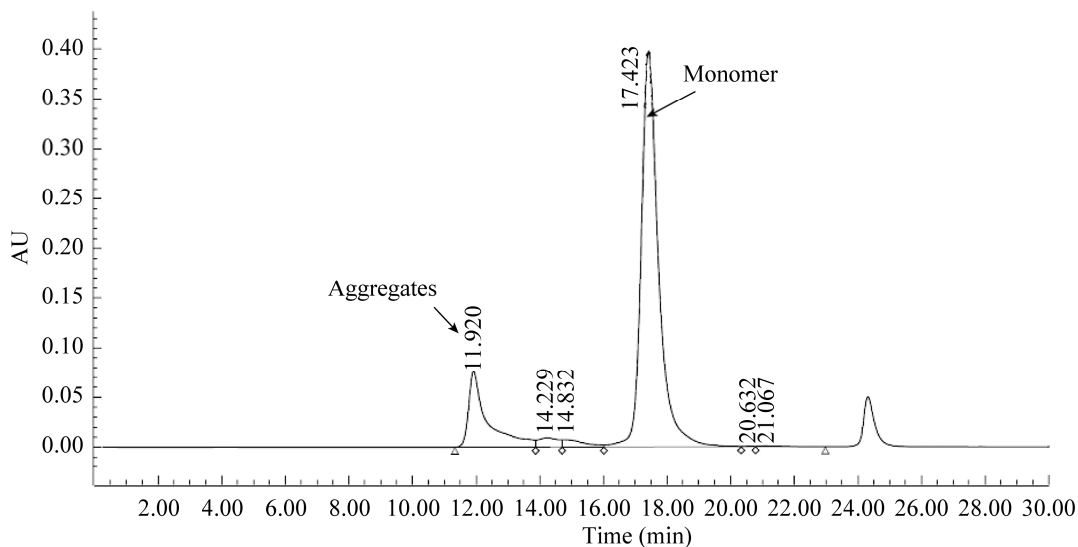


图 5 聚体挑战实验对照样品 SEC-HPLC 检测图谱

Figure 5 CK sample SEC-HPLC chromatogram of aggregates spike study.

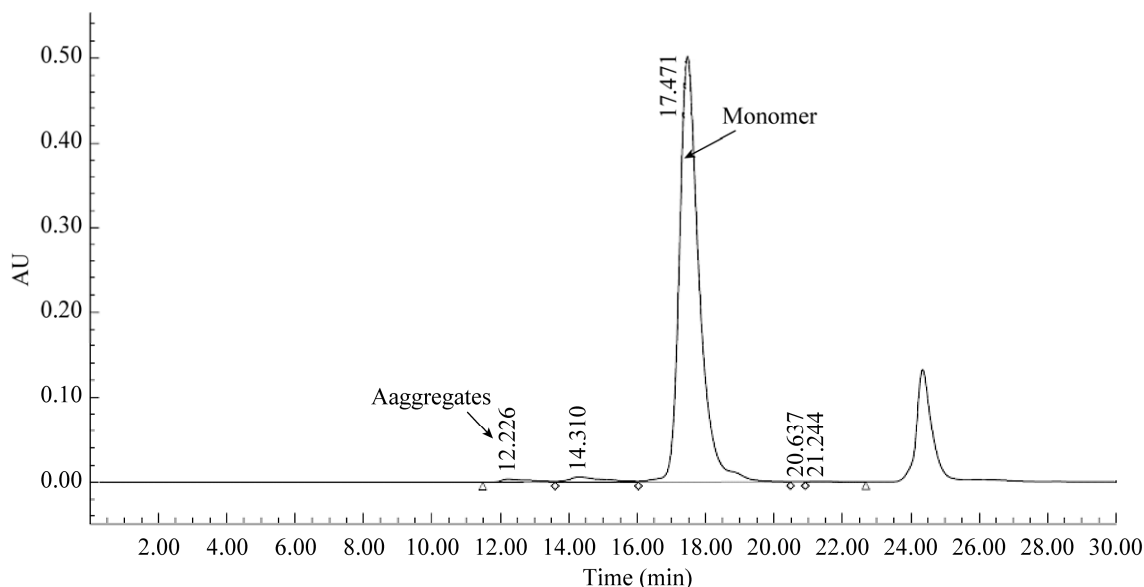


图 6 聚体挑战实验 1 收集样品 SEC-HPLC 纯度检测图谱

Figure 6 Experiment run 1 sample SEC-HPLC chromatogram of aggregates spike study.

想的替代品除了对环境友好之外，首先需要满足具有同等的病毒灭活能力^[17]。CA 沉淀处理除了可以降低 HCP 残留、减少聚体含量、提高 SEC-HPLC 纯度外，还具有灭活病毒的能力^[6-9]。

为了评估 CA 沉淀法灭活病毒的能力，进行了 3 个批次样品的 CA 沉淀并检测对 X-MuLV 和 PRV 病毒的灭活结果，结果见表 12 和图 7。

表 12 显示，CA 处理对两种模式病毒的去因子均大于 6，批次间稳定，灭活去因子差异均小于 0.5。图 7 病毒灭活动力学曲线表明，在 15 min 的孵育后实现完全灭活，批次间无差异，说明 CA 灭活病毒的效率高，灭活过程稳健。X-MuLV 和 PRV 均是脂包膜病毒，亲脂性的和非离子化形式的 CA 可以破坏病毒的脂质膜，

表 12 CA 处理病毒去除因子

Table 12 CA treatment virus removal factor

Model virus	Lot 1	Lot 2	Lot 3
X-MuLV	>6.48±0.05	>6.46±0.02	>6.49±0.10
PRV	>7.00±0.23	>6.85±0.25	>7.10±0.18

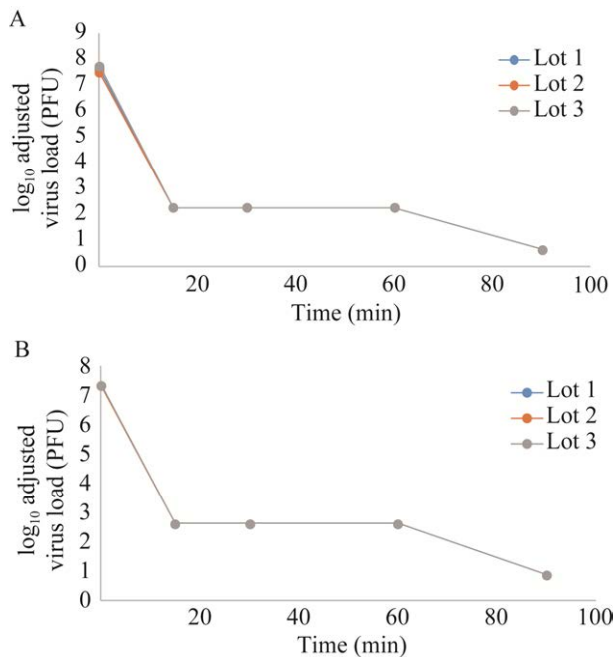


图 7 CA 处理病毒灭活动力学曲线

Figure 7 Kinetic curve of CA treated virus inactivation. A: RRV log reduction value. B: X-MuLV log reduction value.

因此 CA 具有显著的灭活脂包膜病毒效果^[11-13]。

本研究结果表明, CA 沉淀处理的病毒灭活作用大于 4, 是一个稳健而有效的病毒清除步骤。CA 可生物分解, 更加绿色环保, 用量更低, 因此可以替代 Triton X-100, 与常用的低 pH 灭活及除病毒过滤互补, 为抗体产品提供额外的安全阈值。

2.4 中试放大

为研究 CA 沉淀方法及小试参数是否具有可放大性, 即用于生产规模的可行性及效果, 本研究将 CA 沉淀法用于 500 L 细胞培养规模,

进行了放大生产。

2.4.1 搅拌混合对 CA 沉淀的影响

搅拌混合效果受搅拌器的结构和运行参数、容器结构等各方面的影响, 通过实验研究可以得到不同形式搅拌器同等混合效果的运行参数, 以进行放大和缩小规模的研究^[18]。由于在大规模生产中, 搅拌混合可能会影响 CA 沉淀效果, 因此, 中试生产前首先研究了搅拌转速和搅拌时间对 CA 沉淀的影响, 以得到实验室规模 CA 沉淀的搅拌参数, 然后控制生产规模与实验室规模的溶液混匀效果相同, 通过实验室规模的搅拌转速换算出中试生产规模的搅拌转速。本实验搅拌转速选择 100、260、400 r/min, 在 100 r/min 时液体表面无明显波动, 260 r/min 时液体表面有微弱的波动, 400 r/min 时液体表面可见形状不定的小漩涡, 搅拌混合时间选择 90、360 min, 结果见表 13 和表 14。

表 13 结果表明, CA 沉淀搅拌转速对收率和产品 SEC-HPLC 纯度无明显影响, 对 HCP 的残留影响显著, 转速越大, HCP 残留越小, 搅拌转速提高 4 倍, HCP 残留降低 11 倍, 因此应选择混合效果良好的生产设备。表 14 结果表明, CA 沉淀混合时间对收率和产品 SEC-HPLC 纯度无明显影响, 对 HCP 去除有影响。为提高产品质量同时兼顾生产效率, 搅拌时间设置为 90–360 min, 搅拌转速设置为 400 r/min。GE 公司的 XDM 系列一次性搅拌混合器具有良好的搅拌混合性, 在 60 r/min 及以上可实现待处理量的液体表面形状不定的小漩涡, 认为与小试 400 r/min 是混合效果相同。本研究在 500 L 规模的中试生产中采用了 200 L 的 XDM 一次性混合器, 设置搅拌时间 90 min, 搅拌转速设置为 60 r/min。

表 13 搅拌转速对 CA 沉淀的影响结果

Table 13 Effect of stirring speed on CA precipitation

Stirring speed (r/min)	Yield (%)	SEC-HPLC (%)	HCP (ng/mg)
CK (without CA and mixing)	N/A	95.7	6 320.7
100	89.3	97.6	191.9
260	88.0	97.7	107.8
400	83.6	98.0	17.0

表 14 搅拌时间对 CA 沉淀的影响结果

Table 14 Effect of mixing time on CA precipitation

Mixing time (min)	Yield (%)	SEC-HPLC (%)	HCP (ng/mg)
90	85.8	97.3	82.7
360	85.5	97.8	12.9

2.4.2 中试生产

将优化的低 pH 病毒灭活收集液的 CA 沉淀工艺条件在中试规模进行放大试验, 并检测亲和洗脱收集液 SEC-HPLC 纯度和 HCP 残留、CA 沉淀后深层过滤收集液的 SEC-HPLC 纯度、HCP 残留、单抗收率。中试生产中, 为了进一步保障产品质量, CA 沉淀后加一步阳离子层析精纯, 并检测精纯后的收率、SEC-HPLC 纯度和 HCP 残留, 结果如表 15 所示。

表 15 中试结果显示, 亲和洗脱收集液的 SEC-HPLC 纯度为 94.9%, HCP 残留为 6 088.2 ng/mg, 经 CA 沉淀及深层过滤后, SEC-HPLC 纯度为 99.4%, HCP 残留降至 6.8 ng/mg, HCP 去除率为 895 倍, 优于已报道的 100–650 倍^[4-7], 说明优化后的 CA 沉淀能够显著提高单克隆抗体纯度, 降低 HCP 残留。参考药典三部 2020 版^[19]

表 15 中试规模检测结果

Table 15 Test results of pilot scale

Process step	SEC-HPLC (%)	HCP (ng/mg)	Cumulative yield (%)
Protein A chromatography eluate	94.9	6 088.2	N/A
CA precipitation and deep filtration pool	99.4	6.8	79
Cation exchange chromatography eluate	99.5	3.5	65

中康柏西普的质量要求, SEC-HPLC 纯度大于 98.0%, HCP 残留小于 30 ng/mg, CA 沉淀处理后的产品纯度和 HCP 残留已经控制在单克隆抗体质量要求范围内。为保障产品质量, CA 沉淀后加一步阳离子精纯步骤作为冗余步骤, SEC-HPLC 和 HCP 残留略有提高, 抗体质量满足要求。

3 讨论与结论

CA 沉淀的选择性主要取决于蛋白质的 pI、CA 结合位点和位点多少的差异, 不同抗体的最佳 CA 沉淀条件和沉淀效果并不相同^[4]。另外, 影响 CA 沉淀的工艺条件除了本研究所述 pH 和 CA 浓度外, 温度、蛋白浓度、混合时间和缓冲液成分等因素也会影响杂质的去除和目标蛋白的收率; 尤其是蛋白浓度增加, 会使蛋白质相互“拥挤”, 蛋白质单体容易聚合^[20], 可能会导致目标蛋白收率降低。Brodsky 等^[8]的研究表明, 目标蛋白浓度在 4–22 mg/mL 范围内时, 蛋白浓度对 CA 沉淀收率和杂质去除无影响, pH 和 CA 浓度是关键影响因素, 这可能是由于蛋白浓度的变化引起了 CA 沉淀阈值的变化, 蛋白浓度的提高导致可结合在蛋白上的 CA 的相对比例下降, 产生了减少沉淀的负效应^[14], 抵消了蛋白浓度升高引起沉淀增加的正效应, 因此收率的差异不明显。在前人研究的基础上, 本研究主要探讨了 pH 和 CA 浓度的影响, 以提高这 2 个主要因子的功效。针对不同的 CA 沉淀应用场景需要考虑不同的实验设计。

需要注意的是, CA 具有两亲性, 当体系中存在表面活性剂时, 正辛酸可能会与表面活性剂共同形成反胶束的结构^[21-22], 此时包被在反胶束内的蛋白质可能难以被沉淀, 影响沉淀效果, 并且可能影响后续层析。Weng 等^[23]在制备抗人血小板抗原(HPA)-1a 的工艺中采用了 CA 沉淀-1% Triton X-100 病毒灭活-阳离子交换层析的纯化方法, 未发现对层析的影响, 可能是由于 CA 的浓度较低, 未达到临界胶束浓度。本研究中 CA 沉淀是在水相中进行, 未添加表面活性剂, 无此类现象。

本研究对 CA 沉淀小试应用研究和 500 L 规模放大生产的结果表明, 在亲和层析后低 pH 病毒灭活收集液中进行 CA 沉淀可以在比较大的参数范围内操作, 并且处理体积较小、需要的处理时间较短、使用最少的处理试剂。亲和层析后 CA 沉淀能够实现大规模生产, 重现小试的研究结果。CA 沉淀后仅采用一步精纯法即可, 下游纯化工艺可以减少一个精纯步骤, 使得生产周期更短、收率更高、生产效率更高, 节省设备和人工等各种投入。CA 沉淀具有优异的聚集体去除能力和显著的灭活脂包膜病毒的效果, 是一种潜在的 Triton X-100 替代品。另外, CA 沉淀可以在现有的储液罐中进行生产, 减少了额外的资金投入。总之, CA 沉淀是一种潜在的高通量低成本层析替代工艺, 该方法在抗体制药工业中的应用具有提高生产效率及降低成本的优势。

致谢

感谢信达生物(苏州)有限公司工艺开发部和产品开发部的实验室支持, 感谢周凯松博士和其他实验室同事在实验期间提供的指导和帮助。

REFERENCES

- [1] ECKER DM, JONES SD, LEVINE HL. The therapeutic monoclonal antibody market[J]. *MAbs*, 2015, 7(1): 9-14.
- [2] 李红梅. 医保谈判的背后是人民至上[J]. *理财(审计版)*, 2021(1): 1.
LI HM. Behind the medical insurance negotiations is the people first[J]. *Financial Management*, 2021(1): 1 (in Chinese).
- [3] GRONEMEYER P, DITZ R, STRUBE J. Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing[J]. *Bioengineering*, 2014, 1(4): 188-212.
- [4] GOTTSCHALK U. *Process Scale Purification of Antibodies*[M]. Second edition. John Wiley & Sons, 2018: 87-88, 113-114.
- [5] CHAHAR DS, RAVINDRAN S, PISAL SS. Monoclonal antibody purification and its progression to commercial scale[J]. *Biologicals*, 2020, 63:1-13.
- [6] STEINBUCH M, AUDRAN R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1969, 134(2): 279-284.
- [7] LI Y. The application of caprylic acid in downstream processing of monoclonal antibodies[J]. *Protein Expression and Purification*, 2019, 153: 92-96.
- [8] BRODSKY Y, ZHANG C, YIGZAW Y, VEDANTHAM G. Caprylic acid precipitation method for impurity reduction: an alternative to conventional chromatography for monoclonal antibody purification[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(10): 2589-2598.
- [9] TRAPP A, FAUDE A, HÖROLD N, SCHUBERT S, FAUST S, GROB T, SCHMIDT S. Multiple functions of caprylic acid-induced impurity precipitation for process intensification in monoclonal antibody purification[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 279: 13-21.
- [10] ZHENG J, WANG L, TWAROWSKA B, LAINO S, SPARKS C, SMITH T, RUSSELL R, WANG M. Caprylic acid-induced impurity precipitation from protein A capture column elution pool to enable a two-chromatography-step process for monoclonal antibody purification[J]. *Biotechnology Progress*, 2015, 31(6): 1515-1525.
- [11] JOHNSTON A, UREN E, JOHNSTONE D, WU J. Low pH, caprylate incubation as a second viral inactivation step in the manufacture of albumin[J]. *Biologicals*, 2003, 31(3): 213-221.

- [12] KORNEYEVA M, HOTTA J, LEBING W, ROSENTHAL RS, FRANKS L, PETTEWAY SR JR. Enveloped virus inactivation by caprylate: a robust alternative to solvent-detergent treatment in plasma derived intermediates[J]. *Biologicals*, 2002, 30(2): 153-162.
- [13] LUNDBLAD JL, SENG RL. Inactivation of lipid-enveloped viruses in proteins by caprylate[J]. *Vox Sanguinis*, 1991, 60(2): 75-81.
- [14] MORAIS V, MASSALDI H. A model mechanism for protein precipitation by caprylic acid: application to plasma purification[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2012, 59(1): 50-54.
- [15] CHEN Q, TOH P, SUN Y, LATIFF SMA, HOI A, XIAN M, ZHANG HB, NIAN R, ZHANG W, GAGNON P. Histone-dependent IgG conservation in octanoic acid precipitation and its mechanism[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(23): 9933-9941.
- [16] 赛文博, 郭胜楠, 魏开坤. 重组治疗用生物技术产品临床试验申报阶段病毒安全控制的一般考量[J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(21): 1956-1960.
- SAI WB, GUO SN, WEI KK. General considerations for viral safety control of recombinant therapeutic biotechnological products during the CTA phase[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2021, 30(21): 1956-1960 (in Chinese).
- [17] FARCET JB, KINDERMANN J, KARBIENER M, KREIL TR. Development of a Triton X-100 replacement for effective virus inactivation in biotechnology processes[J]. *Engineering Reports*, 2019, 1(5): e12078.
- [18] GIKANGA B, CHEN Y, STAUCH OB, MAA YF. Mixing monoclonal antibody formulations using bottom-mounted mixers: impact of mechanism and design on drug product quality[J]. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2015, 69(2): 284-296.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版三部[M]. 北京: 中国医药科技出版社. 2020: 374-377.
- Chinese Pharmacopoeia Commission Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2020 Volume III[M]. Beijing: China Medical Science Press. 2020: 374-377 (in Chinese).
- [20] WANG W, ROBERTS CJ. Protein aggregation mechanisms, detection, and control[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 550(1/2): 251-268.
- [21] MELO EP, AIRES-BARROS MR, CABRAL JMS. Reverse micelles and protein biotechnology[M]// *Biotechnology Annual Review*. Amsterdam: Elsevier, 2001: 87-129.
- [22] DUTTA P, FENDLER JH. Preparation of cadmium sulfide nanoparticles in self-reproducing reversed micelles[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002, 247(1): 47-53.
- [23] WENG YJ, HUSEBEKK A, SKOGEN B, KJAER M, LIN LT, BURNOUF T. Anti-human platelet antigen-1a immunoglobulin G preparation intended to prevent fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162973.

(本文责编 郝丽芳)